1P229

PLC- δ 1 PH domain-脂質二重膜間の非特異的疎水性相互作用による膜結合性の評価

○上釜 奈緒子、杉田 多喜男、岡田 雅司、八木澤 仁、辻 暁
(兵庫県立大院・生命理学・生命科学)

Phospholipase C- δ 1(PLC- δ 1)は細胞内情報伝達の過程において生体膜成分であるPI(4,5) P_2 を加水分解し、セカンドメッセンジャーであるIP $_3$ およびDGを産生する。生体膜上で機能する際、PLC- δ 1はN末端に位置するPH domainのPI(4,5) P_2 特異的認識結合を介して生体膜に結合する。我々は以前、固体高分解能NMR測定結果を基に、PLC- δ 1 PH domainは脂質膜結合時にPI(4,5) P_2 特異的結合部位とは異なる β 5/ β 6 loop周辺領域に局所的構造変化を生じることが示した。さらに、この変化は β 5/ β 6 loopに含まれる両親媒性の α 2 helixと脂質膜内部の疎水部間における非特異的相互作用に起因し、その結果PLC- δ 1 PH domainの膜結合力を高める可能性を示唆した。我々は次のステップとして、 α 2 helixを介したPLC- δ 1-脂質二重膜間の非特異的相互作用に対する評価を行うため、 α 2 helixに含まれるLys86をhelixブレーカーであるPro、または両親媒性を弱める目的でAlaに置換した部位特異的変異体(K86P、K86A)を作製した。ビオチン化脂質(biotin-DHPE、biotin-X-DHPE)とストレプトアビジンを用いたSUV凝集沈降実験系を適用することで、野生型を含むこれらのタンパク質とSUVとの結合量を評価した。さらに、本実験室の固体高分解能NMR測定結果より脂質膜中のPSの有無および外部溶液へのNa $^+$ 、Mg $^{2+}$ 添加が β 5/ β 6 loop周辺領域の運動性に影響を与えることが示されたことから、これらの系に対応する条件で同様の実験を行い、脂質組成の変化に伴う運動性の変化がPLC- δ 1 PH domainの結合能に与える影響について評価を行った。

N.Uekama, T.Sugita, M.Okada, H.Yagisawa and S.Tuzi : Evaluation of the membrane-binding capacity of the Phospholipase C-delta1 PH domain through the non-specific and hydrophobic interaction

1P231

固体NMRによるPLC- δ 1PHドメインの脂質膜上における構造と挙動の解析：コレステロールの影響

○畠山 明子、杉田 多喜男、岡田 雅司、八木澤 仁、辻 暁
(兵庫県立大院・生命理)

ホスホリパーゼC- δ 1(PLC- δ 1)は細胞内情報伝達系に含まれるタンパク質で、細胞膜中のPI(4,5) P_2 を特異的に認識、加水分解することでセカンドメッセンジャーを産生する。このような膜表在性タンパク質の機能を理解するには、生体中で機能を発現する際の環境に近い脂質膜結合状態での構造解析が必要となる。本研究では固体高分解能NMR分光法による解析により、PLC- δ 1の膜認識部位であるPHドメインが脂質膜(PC/PIP $_2$ 膜)表面において水溶液中とは異なる立体構造をとることを見出した。本研究では、生体中に多く存在し膜の物性に影響を与えるコレステロールに注目し、脂質膜表面のPLC- δ 1 PHドメインの構造や挙動へのコレステロールの影響を解析した。試料として、異なる濃度のコレステロールを含むPC/PI(4,5) P_2 膜に[3- 13 C]Ala標識したPLC- δ 1 PHドメインを結合させたベシクル複合体を用い、脂質とタンパク質の構造を固体 13 C NMRと 1 H MAS NMRを用いて解析した。固体 13 C NMRスペクトルは、PHドメインが0~20%コレステロールを含む膜上で大きな構造変化を生じないことを示した。一方、コレステロールの添加により生じる交差緩和効率の減少から、コレステロール存在下におけるPHドメインの運動性の増加が見出された。 1 H MAS NMRによる脂質の観測では、タンパク質の結合による=CH-CH $_2$ -CH=の信号の変化より、PI(4,5) P_2 のアシル鎖に含まれるアラキドニル基の構造がPHドメインおよびコレステロールの有無によって変化することが見出された。さらに、コレステロールの添加によるタンパク質の運動性の変化と脂質疎水部の構造変化との関連性について議論する。

A.Hatakeyama, T.Sugita, M.Okada, H.Yagisawa and S.Tuzi : Effect of cholesterol on structure and dynamics of PLC-delta1 PH domain at membrane surface by solid state NMR

1P230

固体高分解能NMRによるPLC- δ 1阻害剤U73122の作用機構の解析

○中野 雅章、岡田 雅司、八木澤 仁、辻 暁 (兵庫県大院・生命理・生命科学)

PhospholipaseC- δ 1は細胞内信号伝達系に含まれる脂質加水分解酵素であり、生体膜成分であるPtdIns(4,5) P_2 の特異的加水分解により、セカンドメッセンジャーであるIns(1,4,5) P_3 とdiacylglycerolを産生する。本研究では脂質二重膜上におけるタンパク質の構造情報を得るために有利な手法である固体NMRを用い、PLCの選択的阻害剤であるU73122とPLC- δ 1の脂質膜上における相互作用を解析した。U73122は膜透過性のアミノステロイド化合物であり、細胞中におけるPLC活性の特異的阻害剤として広く用いられているが、その阻害のメカニズムは十分明らかになっていない。ここではU73122が疎水性の高いステロイド骨格を持ち、脂質膜疎水部へ分配することに注目し、U73122が脂質二重膜上のPLC- δ 1の動的構造に及ぼす影響を固体NMR分光法により解析した。PLC- δ 1中のアラニン残基側鎖メチル炭素に生合成的に 13 C標識を導入し、緩衝液中に懸濁した脂質二重膜ベシクル(PC:PIP $_2$ =20:1)に結合した条件下で固体NMR測定を行った。PLC- δ 1の二次構造を反映するアラニン残基の固体 13 C NMRスペクトルが、U73122の添加により変化しないことから、U73122は脂質膜上におけるPLC- δ 1の立体構造を大きく変えていないことが見出された。これに対し、CP-MASにより観測される交差緩和効率の変化は、U73122の添加が脂質膜上におけるPLC- δ 1の運動性を低下させていることを示した。このような脂質二重膜上におけるPLC- δ 1の動的構造の変化の機構と活性阻害機構の関連を議論する。

M.Nakano, M.Okada, H.Yagisawa and S.Tuzi : Solid state NMR study of inhibition mechanism of PLC by U73122

1P232

神経軸索伸長期の嗅細胞軸索におけるTRPV2の発現

松井 等、○柏柳 誠 (旭医・第二生理)

神経の軸索伸長やガイダンスには、神経成長因子や接着分子の結合によって引き起こされる細胞内カルシウムイオン濃度変化が重要な働きをすることが知られている。これらは膜上のイオンチャネルを介して、細胞内カルシウムストアや細胞外からのカルシウムイオン流入により行われているが、神経軸索伸長時にどのようにカルシウムシグナルが調節されるか、まだ不明な点が多い。一方、匂い物質を受容する部位として機能する嗅上皮に存在する嗅細胞は、一次中枢である嗅球まで軸索の末端を延ばしている。嗅細胞は30日ほどの周期で細胞死と再生を繰り返すという、他の神経細胞とは異なる特徴を持っている。したがって、嗅細胞の軸索伸長のメカニズムを明らかにすることができれば、成体ではほとんど起こらない一般的な神経細胞の軸索伸長を促す方法を考えることが期待できる。我々は、非選択性陽イオンチャネルとして最近注目されているTRP(Transient receptor potential)ファミリーのマウス嗅覚系における発現解析を行ったところ、いくつかのTRPメンバーが嗅細胞に発現していることを見出した。そのなかで、嗅細胞の軸索に特異的に局在するTRPV2に着目して、さらに胎児期におけるタンパク局在部位解析を行った。これまでの結果は、TRPV2が伸長時期の嗅細胞軸索に局在することを示しており、軸索伸長時の細胞内カルシウムシグナル調節に重要な働きをしていることが考えられる。

H.Matsui and M.Kashiwayanagi : Expression of TRPV2 in the axon of olfactory cells at the period of neurite outgrowth